



УКРАЇНА

(19) UA (11) 95567 (13) C2

(51) МПК (2011.01)  
A61K 36/76 (2006.01)  
A61K 127/00 (2006.01)  
A61P 5/26 (2006.01)  
A61P 25/04 (2006.01)  
A61P 29/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ЗАСОБУ З ПРОТИЗАПАЛЬНОЮ, АНАЛЬГЕТИЧНОЮ ТА ДІУРЕТИЧНОЮ АКТИВНІСТЮ

1

2

(21) а201006277

(22) 25.05.2010

(24) 10.08.2011

(46) 10.08.2011, Бюл.№ 15, 2011 р.

(72) РУДНИК АННА МИХАЙЛІВНА, КРАВЧЕНКО  
ВІРА МИКОЛАЇВНА, КОВАЛЬОВ ВОЛОДИМИР  
МИКОЛАЙОВИЧ, БОРОДІНА НАТАЛІЯ ВАЛЕРІЇВ-  
НА, ДЕНИС АНТОНІНА ІГОРІВНА, ГРОШОВИЙ  
ТАРАС АНДРІЙОВИЧ

(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІ-  
ВЕРСИТЕТ

(56) UA A 8568, 01.01.2005.

UA C2 73209, 25.06.2005.

RU C1 2104709, 20.02.1998.

RU C1 2179577, 20.02.2002.

RU C1 2322501, 20.04.2008.

RU C1 2135201, 20.04.1998.

RU C1 2152797, 20.07.2000.

UA C2 77347, 15.11.2006.

(57) 1. Спосіб одержання засобу з протизапальною, анальгетичною та діуретичною активністю, що включає неодноразову екстракцію рослинної сировини спиртом етиловим при загальному співвідношенні сировини до екстрагенту як 1:9 - 1:11, об'єднання одержаних екстрактів та їх упарювання, який **відрізняється** тим, що екстракції піддають листя тополі китайської 49-51 % спиртом етиловим при температурі 60-80 °С послідовно тричі по 2 години, а об'єднаний екстракт додатково відстоюють, фільтрують і концентрують до одержання сухого залишку.

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що об'єднаний екстракт відстоюють при температурі від +5 °С до +10 °С протягом 24-48 годин.

Винахід належить до фармації та медицини, а саме до способів одержання біологічно активних речовин з рослинної сировини, у формі сухих екстрактів, придатних для використання у складі фармацевтичних препаратів у різних лікарських формах, призначених, насамперед, для застосування в урологічній практиці.

Останнім часом зросла популярність фітотерапії, що пояснюється рядом причин. Лікарські препарати рослинного походження у багатьох випадках діють більш м'яко, ніж синтетичні. Вони мають менше побічних ефектів у порівнянні з хімічними препаратами, рідко викликають алергічні реакції. Перспективним сировинним джерелом є листя деревинних порід рослин, які дозволяють одержувати засоби з широким спектром комплексної фармакологічної дії.

Відомий спосіб одержання засобу з протизапальною та антимікробною дією [1] шляхом екстракції листя берези 70 % етанолом при оптимальному співвідношенні сировини : екстрагент 1:5.

Проте, одержаний засіб у формі спиртової на-

стойки не проявляє діуретичної та анальгетичної дії, а також не може бути рекомендований широкому колу хворих внаслідок високого вмісту алкоголю.

Відомий також спосіб одержання ранозагоювального та антимікробного засобу [2], що полягає у трикратній екстракції листя горіху волоського 35-45 % спиртом етиловим при загальному співвідношенні сировини : екстрагент 1:5 з подальшим об'єднанням одержаних екстрактів, відстоюванням при 6-10 °С та концентрації до стану густого або сухого екстрактів. Спосіб включає замочування сировини на 2 години, першу екстракцію протягом 24-48 годин, другу і третю екстракцію по 6-12 годин, відстоювання об'єднаних екстрактів протягом 3-х діб.

До недоліків відомого способу можна віднести його довготривалість. Крім того, він не придатний до одержання засобу з комплексною протизапальною, анальгетичною та діуретичною дією.

Відомий спосіб одержання засобу з протизапальною, антимікробною та діуретичною дією із

(13) C2

(11) 95567

(19) UA

листя груші [3], який включає екстракцію сировини 10 спиртом етиловим при співвідношенні сировина : екстрагент (1: 9) - (1:11) протягом 9-11 годин, упарювання одержаного екстракту до 1/18 - 1/20 попереднього об'єму. Згідно з відомим способом сировину піддають екстракції 5-7 разів новими порціями екстрагенту, а одержані екстракти об'єднують. Сухий залишок - 24,3 %.

Проте, зазначений спосіб не дозволяє одержати засіб, що проявляє додаткову аналгетичну дію, доречну при лікуванні запальних процесів сечовидільної системи.

Задача винаходу полягає у створенні способу одержання засобу рослинного походження з комплексною протизапальною, аналгетичною та діуретичною активністю шляхом водно-спиртової екстракції листя тополі китайської при заданих параметрах способу, що дозволяє скоротити час проведення процесу, підвищити вихід і розширити спектр специфічної активності продукту.

Поставлена задача вирішується таким чином, що у способі одержання засобу з протизапальною, аналгетичною, діуретичною активністю, що включає неодноразову екстракцію рослинної сировини спиртом етиловим при загальному співвідношенні сировини до екстрагенту 1:9-1:11, об'єднання одержаних екстрактів та їх упарювання, у відповідності з винаходом екстракції піддають листя тополі китайської 49-51 % спиртом етиловим при температурі 60 - 80°C послідовно тричі по 2 години новими порціями екстрагента, об'єднаний екстракт

додатково відстоюють, фільтрують і концентрують до одержання сухого залишку.

Винаходом передбачено, що об'єднаний екстракт відстоюють при температурі від +5 °C до +10 °C протягом 24-48 годин.

Всі параметри заявленого способу визначені експериментальним шляхом.

Сукупність ознак способу є новою, не відомою з джерел інформації.

Тополі китайська (*Populus Simonii* Carr.) поширена на території України, як декоративна рослина [4]. З літературних джерел не відомо використання тополі китайської з лікувальною метою, хоча листя та бруньки інших видів тополь (тополі чорної, тополі тремтячої) використовують як у народній так і у офіційній медицині.

Авторами вперше було досліджено фармакологічну активність листя тополі китайської, що дає можливість розширити перелік засобів рослинного походження з протизапальною, аналгетичною та діуретичною активністю.

Вибір 49-51 % спирту етилового як екстрагенту обумовлений його здатністю найбільш повно вилучити з листя тополі китайської комплексу біологічно активних речовин (БАР) з заданим спектром фармакологічної активності. При здійсненні серії експериментів з визначення концентрації екстрагенту було встановлено, що вичерпна екстракція комплексу БАР забезпечується 49-51 % етанолом. Дані експерименту наведені у таблиці 1.

Таблиця 1

Кількісний вихід екстрактивних речовин з листя тополі китайської при використанні різних екстрагентів

Екстрагент	вода	20 % етанол	50 % етанол	70 % етанол	96 % етанол
Кількісний вихід екстрактивних речовин, %	34,49	35,82	36,98	36,80	30,06

Визначені експериментальним шляхом такі ознаки, як співвідношення сировина : екстрагент 1:9 - 1:11, тривалість екстракції протягом 2 годин при нагріванні до 60-80 °C з двократною заміною екстрагенту дозволяє максимально вилучити БАР з комплексною протизапальною, аналгетичною та діуретичною активністю з сировини при найменшій витраті часу і забезпечити високий вихід сухого екстракту на рівні 32 %.

Очищення об'єданого екстракту здійснюється його відстоюванням при температурі від +5 °C до +10 °C протягом 24-48 годин., що призводить до осадження частинок сировини та відокремлення осаду шляхом фільтрування.

Концентрування одержаного екстракту доцільно здійснювати шляхом упарювання під вакуумом. Для упарювання екстракту оптимальним є інтервал температур 60-70 °C, який обумовлений концентрацією етанолу в екстрагенті. При зменшенні температури збільшується час упарювання, при збільшенні можливе руйнування термолабільних речовин.

Експериментально був здійснений вибір сировини в залежності від фази вегетації тополі китайської. Результати дослідження динаміки накопичення фенольних сполук у листі тополі китайської у різні терміни заготівлі наведені у табл. 2.

Таблиця 2

Кількісний вміст фенольних сполук у листі тополі китайської в залежності від фази вегетації.

Група БАР	Травень	Червень	Липень	Серпень	Вересень	Жовтень
Гідроксикоричні кислоти, %	3,97	3,62	3,23	2,93	2,88	2,73
Флавоноїди, %	2,07	1,84	1,46	0,94	2,05	1,6
Дубильні речовини, %	4,99	4,63	4,15	3,32	4,92	4,56

Дані табл. 2 свідчать, що найбільша кількість фенольних сполук у листі тополі китайської накопичуються у травні, тому для одержання з листа тополі китайської комплексу БАР з протизапальною, анальгетичною та діуретичною активністю раціонально використовувати сировину, заготовлену саме у травні.

Заявлений спосіб здійснюють таким чином. Повітряно-сухе листя тополі китайської екстрагують 49-51 % етанолом, при співвідношенні сировина : екстрагент 1:9 - 1:11, тричі протягом 2 годин, при нагріванні до 60-80 °С. Об'єднаний екстракт відстоюють при температурі (+5 °С) - (+10 °С) протягом 24-48 годин, фільтрують та концентрують переважно шляхом упарювання під вакуумом при температурі 60-70 °С до одержання сухого залишку.

Одержаний сухий екстракт листя тополі китайської - гігроскопічний порошок гірчично-зеленуватого кольору, зі специфічним запахом, гіркий на смак, добре розчинний у 40-80 % спирті та киплячій воді, практично нерозчинний в ефірі, хлороформі.

Вихід продукту 32 %.

Винахід ілюструється прикладами.

Приклад 1. 1,5 кг подрібненого повітряно-сухого листя тополі китайської поміщають у реактор з підігрівом, заливають 50 % етанолом та екстрагують при температурі 70 °С протягом 2 годин при періодичному перемішуванні. Другу екстракцію проводять за попередніх умов. Загальне співвідношення сировина : екстрагент складає 1:10. Одержані екстракти об'єднують відстоюють при температурі +5 °С протягом 24 годин, фільтрують і випарюють у вакуумі при температурі 65 °С до отримання сухого продукту. Одержують 480 г сухого продукту. Вихід – 32 %.

Приклад 2. Протизапальну активність одержаного за заявленим способом екстракту, вивчали на моделі карагенінового набряку стопи у щурів, за антиексудативними властивостями екстракту, який досліджували у дозах 1 мг/кг, 2 мг/кг, 5 мг/кг та 10 мг/кг. Препаратами порівняння слугували альтан та вольтарен в ефективних дозах - 1 мг/кг та 8 мг/кг відповідно. Дослідження проводили на 6 групах стандартизованих білих щурів обох статей масою від 180 до 200 г по 6 тварин у групі. Набряк стопи у щурів викликали субплантарним введенням 0,05 мл 1 % розчину карагеніну в одну із задніх кінцівок тварин дослідних та контрольних груп через 1 годину після інтрагастрального введення досліджуваного екстракту у різних дозах та препаратів порівняння. Контрольна група щурів одержувала еквівалентну кількість води.

Про розвиток набряку судили за загальним збільшенням стопи, який вимірювали через 1 годину (при максимальному розвитку запального процесу) за допомогою механічного онкометра за А. С. Захаревським.

Протизапальну активність досліджуваних засобів визначали за здатністю зменшувати набряк стопи у дослідних тварин у порівнянні з контрольними. Розрахунок проводили за формулою:

$$A = \frac{(\Delta V_K - \Delta V_A) \cdot 100\%}{\Delta V_K};$$

де: A - протизапальна активність, %

$\Delta V_K$  і  $\Delta V_A$  - різниця об'ємів стопи до та після введення карагеніну у контрольній і дослідних групах. Результати дослідження наведено у таблиці 3.

Таблиця 3

Протизапальна активність сухого екстракту з листа тополі китайської, одержаного за заявленим способом

Варіанти дослідів		Величина набряку, умовні одиниці	Активність, %
Контроль		24,0±4,10	-
Альтан, 1 мг/кг		6,5±0,62	72,9
Вольтарен, 8 мг/кг		8,0±2,05	66,7*
Сухий екстракт з листа тополі китай- ської	1 мг/кг	5,3±1,53	75,8*
	2 мг/кг	11,0±3,76	54,2
	5 мг/кг	6,0±2,39	74,9*
	10 мг/кг	11,0±3,76	54,2

Примітка: \* - різниця достовірна у порівнянні з контрольною групою тварин (P < 0,05).

Отримані дані свідчать, що сухий екстракт з листа тополі китайської, одержаний за заявленим способом, виявив виражену протизапальну активність у дозі 1 мг/кг (76 %) та 5 мг/кг (75 %), яка більша ніж у альтану на 3 % та вольтарену - на 9 %.

Приклад 3. Анальгетичну активність екстракту, одержаного за заявленим способом, вивчали на моделі "оцтовокислих корчів" на білих щурах,

які були розподілені на 7 груп: дослідні; ті, яких лікували досліджуваним екстрактом у дозах 25, 50, 100, 150, 200 мг/кг; ті, яких лікували препаратом порівняння анальгіном, і контрольні. Анальгетичну активність оцінювали за здатністю зменшувати кількість "оцтовокислих корчів" і виражали у відсотках.

Розрахунок проводили за такою формулою:

$$AA = \frac{(C_K - C_D) \cdot 100\%}{C_K};$$

де: AA - анальгетична активність,

$C_K$  і  $C_D$  - середня кількість корчів у тварин контрольної і дослідної групи. Результати дослідів наведені у таблиці 4.

Таблиця 4.

Анальгетична активність сухого екстракту з листя тополі китайської, одержанного за заявленим способом

Варіанти дослідів		Кількість корчів, $M \pm m$	Активність, %
Контроль		30±4,22	-
Анальгін, 55 мг/кг		9±1,25	70**
Сухий екстракт з листя тополі китайської	25 мг/кг	10±2,05	66**
	50 мг/кг	11±1,02	63**
	100 мг/кг	10±2,05	66**
	150 мг/кг	14±3,76	53*
	200 мг/кг	9±2,39	70**

Примітка: \* , \*\* - різниця достовірна у порівнянні з контрольною групою тварин (\*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,001$ ).

Згідно з даними, наведеними у таблиці 4, екстракт з листя тополі китайської у дозах - 25, 50, 100, 200 мг/кг виявив виражену анальгетичну активність. У дозі 25 та 100 мг/кг вона була меншою за активність анальгіну на 4 %, а у дозі 200 мг/кг - порівнювала їй.

Приклад 4. Вивчення діуретичної активності екстракту, одержаного за заявленим способом, властивостей проводили в умовах навантажувального діурезу на щурах. Досліджуваний екстракт у дозах 50 мг/кг, 100 мг/кг, 150 мг/кг та 200 мг/кг одночасно з водним навантаженням, яке стано-

вило 3 % від маси тіла тварини, вводили внутрішньошлунково. Препаратом порівняння слугував гіпотіазид у ефективній дозі 40 мг/кг. Тварини контрольної групи отримували тільки водне навантаження (3 % від маси тіла), після чого усіх тварин контрольної та досліджуваних груп розміщували в індивідуальні клітки, в яких створені умови для збору сечі. Показником інтенсивності сечовиділення була кількість сечі, яку збирали протягом 3 годин. Кількість сечі, виділену контрольною групою тварин, приймали за 100 %.

Результати дослідів наведені в таблиці 5.

Таблиця 5.

Діуретична активність сухого екстракту з листя тополі китайської, одержаного за заявленим способом.

Варіанти дослідів	Доза, мг/кг	Діурез, $M \pm m$	Активність по відношенню до контролю, %
Контроль		2,41±0,38	
Гіпотіазид	40	3,62±0,36	50,2*
Сухий екстракт з листя тополі китайської	50	2,80±0,28	16,2
	100	3,80±0,59	57,7*
	200	3,67±1,22	52,3*
	500	3,01±0,34	24,9

Примітка: \* - різниця достовірна у порівнянні з контрольною групою тварин ( $P < 0,05$ ).

Аналіз результатів визначення діуретичної активності (таблиця 5) показав, що екстракт з листя тополі китайської у дозах 100 мг/кг і 200 мг/кг проявляє виражену діуретичну активність, яка перевищує активність гіпотіазиду у дозі 40 мг/кг на 7,5 % і 2,1 % відповідно.

Приклад 5. Вивчення гострої токсичності за способом, одержаного за заявленим способом, проводили на білих щурах експрес-методом визна-

чення середньосмертельних доз ( $LD_{50}$ ) хімічних речовин, який потребує незначних затрат часу і обмежену кількість тварин. Ефект оцінювався по загибелі (летальності) тварин при пероральному введенні екстракту.

Результати вивчення гострої токсичності сухого екстракту з листя тополі китайської, одержаного за заявленим способом, наведені в таблиці 6.

Таблиця 6.

Гостра токсичність сухого екстракту з листя тополі китайської, одержаного за заявленим способом

№п/п	Доза, мг/кг	Кількість тварин	Летальність/Кількість тварин
1	2000	5	0/5
2	3000	5	0/5
3	5000	5	0/5
4	7000	5	0/5
5	10000	5	0/5
6	12000	5	0/5
7	15000	5	0/5

Отримані дані дозволяють констатувати, що LD<sub>50</sub> досліджуваного екстракту становить більше 15000 мг/кг, що дає змогу віднести цю субстанцію, відповідно до класифікації К. К. Сидорова, до V класу токсичності - практично нешкідливих сполук.

Таким чином, заявлено спосіб одержання засобу з листя тополі китайської, який проявляє виражену ефективну протизапальну, анальгетичну та діуретичну активність, є практично не токсичним і придатним до тривалого застосування.

Заявлений спосіб простий, технологічний і може бути здійснений на звичайному хіміко-фармацевтичному підприємстві з використанням стандартного обладнання. Спосіб передбачає використання дешевої доступної сировини і забезпечує промислово доцільний вихід готового

продукту, який може бути використаний в якості активної діючої субстанції у складі фармацевтичних препаратів у різних лікарських формах.

Джерела інформації:

1. Деклараційний патент на корисну модель 8568, Україна, МПК 7A61K35/78, заявл. 04.01.2005, опубл. 15.08.2005, Бюл. № 8.

2. Патент на винахід 2152797, Російська федерація, МПК 7A61K35/78, A61P17/02, заявл. 02.06.1999, опубл. 20.07.2000, Бюл. № 20.

3. Патент на винахід 77347, Україна, МПК (2006) A61K36/185, A61K 127/00, A61P29/00, A61P31/00, A61P13/00, заявл. 26.04.2005, опубл. 15.11.2006, Бюл. № 11.

4. Писанный Г. Г., Кулакова С. Г. Лекарственные деревья и кустарники юго-востока Украины. - Донецк, 2006. - 170 с.